

圈卷产色链霉菌 7100 分化相关基因——*sawE* 的结构与功能*

徐健勇 刘 钢 谭华荣**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 :以天蓝色链霉菌的 *whiB* 基因为探针,从圈卷产色链霉菌 7100 的总 DNA 部分文库中克隆了含有 *whiB* 同源序列的 2.8kb DNA 片段,并对其中的 1.4kb 片段进行了序列测定。序列分析表明,该片段含有一个完整的开放阅读框——*sawE*。预测的蛋白质结构及同源性分析显示,*sawE* 与天蓝色链霉菌孢子形成早期的关键基因 *whiB* 高度同源,编码产物为一个调控蛋白。*sawE* 的破坏使圈卷产色链霉菌 7100 的分化终止在气生菌丝阶段,在延长培养时间的情况下仍保持白色的表型,菌丝不能分隔,不能形成成熟的灰色孢子,结果表明 *sawE* 基因是一个与圈卷产色链霉菌分化有关的重要基因。

关键词 :圈卷产色链霉菌, *sawE* 基因, 形态分化

中图分类号 :Q933 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2003)01-0048-08

链霉菌(*Streptomyces*)是一类从土壤中分离的革兰氏阳性细菌,它的生命周期经历了从孢子萌发到基质菌丝和气生菌丝,进一步分化为多细胞的孢子链,最终形成成熟的灰色孢子等可明显区分的不同阶段。链霉菌的另一个显著特点是具有合成次级代谢产物的能力,目前已知的天然抗生素中大约有 60% 是由链霉菌所产生的^[1]。链霉菌发育分化的研究至今已有几十年的历史,有证据表明链霉菌的分化与次级代谢有密切的关系^[2]。链霉菌已经成为当前研究原核生物发育分化的一个良好的模式材料。

在链霉菌发育分化的研究中,Chater 等人分离到多株天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)的突变株。根据对链霉菌分化的影响,可以把链霉菌的分化突变株分为两大类:光秃(*bld*)突变,菌丝体不能形成气生菌丝,表现为光秃的表型;白色(*whi*)突变,菌丝体不能生成成熟的灰色孢子,表现为白色的表型^[3]。针对不同的基因所进行的研究,已经初步阐明了控制天蓝色链霉菌分化的不同的监控点(checkpoint)^[4,5],并相继克隆了不同的 *whi* 基因^[6]。其中 *whiB* 作为控制孢子形成早期的基因,它的突变使天蓝色链霉菌的发育停止在气生菌丝阶段,不能进一步分化,气生菌丝不能分隔,形成较野生型长且更紧密的螺旋,不能形成成熟的灰色孢子,并且在延长培养时间的条件下菌丝体始终保持白色的表型。蛋白质结构预测 *WhiB* 是一个调控因子,可能直接参与了与 DNA 的结合及与其它蛋白质的相互作用。

* 国家自然科学基金重点资助项目(39830010)

** 通讯联系人, E-mail: Tanhr@sun.im.ac.cn

作者简介:徐健勇(1970-),男,大同机车厂医院主管技师,目前主要从事链霉菌分化及抗生素生物合成机制的研究工作。

收稿日期:2002-04-15,修回日期:2002-06-11

用^[7]。对天蓝色链霉菌的 *whiB* 基因转录的研究显示,控制 *whiB* 的启动子有两个,相对靠前的启动子 P1 启动微弱的组成型转录,而下流的启动子 P2 启动的转录在营养期极低,当气生菌丝出现后,迅速升高并很快达到高峰,表现出很强的时序性^[8]。*whiB* 在链霉菌中极其保守,通过对 Genbank 中数据比较得知,目前已知的不同链霉菌种间的 WhiB 的一致性超过 94%,足以说明 WhiB 在链霉菌发育分化中所占据的重要地位。

圈卷产色链霉菌(*S. ansochromogenes*)7100 是从我国东北土壤中分离到的一株尼可霉素产生菌。借助光学显微镜对圈卷产色链霉菌气生菌丝和孢子链形态的观察发现,它与天蓝色链霉菌有很大的不同,后者的气生菌丝具有紧密的多圈螺旋,而前者的气生菌丝只有松散的半圈至多一圈的螺旋^[9]。基于上述差异,我们对圈卷产色链霉菌中 *whiB* 类似基因(*whiB*-like)的结构与功能产生了浓厚的兴趣。首先促使我们提出的一个重要问题是松散螺旋的圈卷产色链霉菌是否有 *whiB* 类似基因的存在;其次,如果存在,则该基因阻断后会不会使圈卷产色链霉菌的形态发生改变。本文报道与圈卷产色链霉菌分化密切相关的 *whiB* 类似基因—*sawE* 的结构与功能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及培养基 圈卷产色链霉菌 7100(野生株)被作为此次实验的主要材料,天蓝色链霉菌 J150(*hisA1*, *uraA1*, *strA1*, *Pgl*⁻, *SCP1*⁻, *SCP2*⁻)作为基因探针的供体,大肠杆菌 DH5 α 用于重组质粒的构建,大肠杆菌 ET12567(*dam*, *dcm*, *hsdS*)用于获得非甲基化的 DNA 来转化链霉菌,上述菌株均为本实验室收藏。大肠杆菌—链霉菌穿梭质粒 pKC1139(apramycin 抗性,在链霉菌中 34℃ 以上不能独立复制)用于基因破坏实验,质粒 pUC18、pBluescript M13⁻ 用于基因的克隆、亚克隆实验。链霉菌培养基 YEME、R2YE、基本培养基(MM)等配制参见文献[10],大肠杆菌 LB 培养基配制参见文献[11]。

1.1.2 抗生素、酶及试剂 氨苄青霉素(100mg/mL H₂O), apramycin(100mg/mL H₂O)作为储备液,于 -20℃ 保存;在 LB 培养基中,氨苄青霉素和 apramycin 的使用浓度为 100 μ g/mL;在 R2YE 培养基中, apramycin 的使用浓度为 50 μ g/mL;在 YEME 培养基和基本培养基中, apramycin 的使用浓度为 10 μ g/mL。实验中所用的各种限制性内切酶购自 Roche 公司;T₄ DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶购自华美生物工程公司;Exonuclease III 和 Mung Bean 核酸酶购自 Promega 公司。IPTG 和 X-gal 用于大肠杆菌转化子的筛选,在 LB 培养基中的使用浓度均为 40 μ g/mL。

1.1.3 DNA 探针的标记及 Southern 杂交 实验所用试剂盒购自 Roche 公司。非放射性地高辛 DNA 随机引物的标记以及 Southern 杂交分析反应的各种相关操作见产品说明书。

1.2 方法

1.2.1 菌株的培养、转化和 DNA 基本操作 链霉菌培养、原生质体转化、染色体 DNA 和质粒提取等操作技术见文献[10],大肠杆菌培养、转化、质粒提取等基本操作见文献[11]。

1.2.2 PCR 反应引物的合成及反应条件 引物 PS1 5'-CAATAGCAGATCTCGGCTTG-3'以及 PS2 5'-GGCTGGGCAGCAAGAGGGCC-3',用于从天蓝色链霉菌中 PCR 扩增 *whiB* 基因;引物 PS3 5'-ATAAGCTTCTCGGCTGGCAGGAGCGCGC-3'(下划线处为 *Hind*III 位点)和 PS4 5'-TT-

GAATTCGGACAGGCCGCCCCAGATGC-3' (下划线处为 *Eco*RI 位点), 用于基因破坏实验, PCR 引物由上海生工生物工程公司合成。PCR 反应的条件均为 95℃ 变性 5min, 延伸 30 个循环 (60℃ 复性 30s, 72℃ 延伸 30s, 95℃ 变性 30s), 60℃ 复性 30s, 72℃ 延伸 5min。PCR 反应产物的纯化参照文献 [11]。

1.2.3 DNA 序列测定和分析: 序列测定由大连宝生物公司完成, DNA 序列开放阅读框分析采用 FramePlot2.3^[12] 程序, 多序列氨基酸同源性的比较采用 clustalx1.81 程序^[13]。

1.2.4 基因破坏: 将基因结构内部的部分 DNA 序列亚克隆到质粒 pKC1139 上, 重组质粒首先在大肠杆菌 DH5 α 中构建, 然后转化大肠杆菌 ET12567, 从中提取去甲基化的重组质粒转化圈卷产色链霉菌原生质体。转化子经确认后, 接种在含 apramycin 的基本培养基上, 28℃ 培养 7d, 制备孢子悬液, 取适量孢子涂布于基本培养基表面, 置于 39℃ 培养。由于在 39℃ 的条件下 pKC1139 在链霉菌中不能独立复制, 必须通过插入片断与染色体的同源序列重组而整合到染色体上。通过筛选具有 apramycin 抗性的重组子, 获得所需的破坏子。

1.2.5 链霉菌的表型及显微观察: 把链霉菌接种在以甘露醇作为唯一碳源的固体基本培养基的表面, 将盖玻片以 45° 斜插入培养基, 在 28℃ 条件下培养, 分别于不同的培养时间将盖玻片取出置于相差显微镜下观察, 并同时观察菌落的表型进行观察。

2 结果和分析

2.1 *sawE* 基因的克隆及序列分析

为了获得完整的 *whiB*-like 基因, 使其能够涵盖基因的调控区, 同时获得其上下游附近的一些基因以便于进行深入的研究, 设计了引物 PS1 和 PS2, 以天蓝色链霉菌 J1501 的总 DNA 为模板, 通过 PCR 反应扩增得到一个 483bp 的 DNA 片段, 将这一片段用地高辛标记作为探针。圈卷产色链霉菌 7100 总 DNA 经 *Pvu*II 完全酶切后用此探针进行杂交, 在 2.8kb 处有一阳性信号带, 回收此大小的片段, 连接到 pBluescript M13⁻ 经 *Eco*RV 酶切后的载体上, 连接混合物转化大肠杆菌 DH5 α , 建立了由 3000 多个菌落构成的部分 DNA 文库。经菌落杂交实验从中筛选到二个与探针有阳性杂交信号的克隆, 经质粒提取, *Pvu*II 酶切及 Southern 杂交分析, 证实其中一个为正确的克隆, 含有 2.8kb 的插入片段, 将该质粒命名为 pBL100。利用 *Exo*III 对该质粒内部的插入片段逐步进行了缩小。

对 2.8kb 插入片段中的 1.4kb 进行了序列测定 (图 1), 分析表明其中含有一个完整的开放阅读框 (ORF1) 及一个不完整的阅读框 (ORF2) (图 2)。ORF1 由 264bp 组成, G + C 含量为 68.5%, 起始密码子为位于 508 位的 ATG, 终止密码子为 769 位的 TGA, 在起始密码子 ATG 的上游 6bp 处有一富含嘌呤 GAGGG 的区域为可能的核糖体结合位点 (RBS)。推测位于 407 ~ 412 处的 TTGACT 和 431 ~ 436 处的 TGTAAT 为可能的启动子的 -10 区和 -35 区, 与天蓝色链霉菌 *whiB*P2 启动子一致, 位于 240 ~ 275 之间的序列与天蓝色链霉菌 *whiB*P1 启动子区域高度同源, 为可能的 *sawE*P1 启动子区, 推测二者之间具有类似的转录调控机制。ORF1 和 ORF2 间隔 181bp, 位于 ORF1 下游的 28 ~ 68bp 之间的反向重复序列可形成非常稳定的茎环结构, 为 ORF1 可能的转录终止子区, 推测 ORF1 为一个单独的转录单元。DNA 序列分析显示, ORF1 编码 87 个氨基酸, 其中带负电荷的酸性氨基酸

20.7% ,带正电荷的碱性氨基酸 14.9% ,疏水性氨基酸仅有 34.5%。蛋白质二级结构预测其可能含有三个主要的 α -螺旋区 ,其中氨基端富含酸性的谷氨酸和天冬氨酸 ,羧基端富含碱性的赖氨酸和精氨酸 ,结构预测未能发现典型的 DNA 结合位点。经与天蓝色链霉菌 *whiB* 序列同源性分析 ,ORF1 与天蓝色链霉菌 *whiB* 基因序列的一致性高达 95% ,所编码的氨基酸序列一致 ,故将 ORF1 命名为 *sawE* (*Streptomyces ansochromogenes* white gene E)。

CTGGGACAGCAGCAACAGCTACAGCGCGCGGGCGGCACCGAGGGACCCGGCGGTGCGG	60
GTCGAGGTGGGTGCCAAGTACGCGAGCATGCCACTAGGACAGCGGTTACACGGGCAGT	120
GTCAACTCGCTGCCCGGTATGTGGGACATGTTTACCTCTTCCGGTTTATTTTCGAGGCG	180
AAAGGTTTGCTCATCGGGGTCCCGGGACACATGGGGCACATCCGAGCGCGGAGCCTCAC	240
GGAACGGGATCGAACACGGAGGCGTCTTTCCCGTACAGAGGATCTGTACGGGGTTCGGC	300
CGCCCCCGCGGGTCCGCTGCGTGTCAAGGTTTATGCCGATTTGAACACTTTCGGCACGG	360
CCTTGGTTCGCGAGAGTGAATAACGGGCCAATAGCAGATCTCGGCTT <u>GACT</u> CGCCGGA	420
GCAGCACACTT <u>GTAATTT</u> CACTCGTGTCTTTCAGCCGGAATCGGTAACGGCCACGCACGG	480
RBS	
GGACGCGAAGACAGACGAGGGGCGCACAT GACCGAGCTGGTGCAGCAACTGCTGGTTCGAC	540
M T E L V Q Q L L V D	
GACGCGGACGAGGAACTCGGCTGGCAGGAGCGCGCACTCTGCGCCAGACCGACCCCGAG	600
D A D E E L G W Q E R A L C A Q T D P E	
TCCTTCTTCCCGGAGAAGGGCGGCTCCACCAGAGAGGCCAAGAAGGTCTGCCTCGCCTGC	660
S F F P E K G G S T R E A K K V C L A C	
GAGGTCCGCTCCGAGTGCCTCGAATACGCCCTCGCCAACGACGAGCGCTTCGGCATCTGG	720
E V R S E C L E Y A L A N D E R F G I W	
GGCGGCCTGTCCGAGCGCGAACGCCCGCCGGCTGAAGAAGGCCGCCGTGTGACCATACGG	780
G G L S E R E R R R L K K A A V *	
CGACCGCGAAGAGTACGAACGGCCCGTCCAGCCGTGGGTTGTCCACAGGCGGGCCCGTCC	840
GTCATGCCAGCCGATAGTGTGGACGCTCGTCCGAGACGCCCGCTGTCCCTCGATCCG	900
CGAGAAGACACAGGCGTCCACCGCAGTCCATCGAACCAGGGGCCCGTACCTCGAT GTCCGT	960
GCACAGCCATGCGGCCGCCAACACCGCGCCGCCACCGCCGGGTTTCGACCCGTCCAGCTC	1020
GGCCGGGTCTGATCCGTCCAGCCCGCGGTGCTTGCACCCGACCCACCCGCCGAGTTCCC	1080
GCGCCATGTGGTGACCGCGGTCTCTCGTCGCCACGACGGCGCCCGCTGGCTGCCCGACGC	1140
GCTCGCCGGGCTGCTCGGCCAGGAGCGCCCCGTCCAGCACGGGTCGCCGCCGACACCGG	1200
GAGCGCGGACGACTCCGCCCGGCTGCTCACCGACGCCCTCGGCGAGGCCAACGTCTTGCA	1260
CCTCGCCCGCCGACCGGCTTCGGCCAGGCCGTGGAGGAGGCCAGCGCACCGCGCCCCCT	1320
CCTCACCCCGGACGACTGCCGTACCTCAAGCGCCCCAGCGGCTGGGACCCGCCACCCG	1380
CACCTGGCGCGACGACGCCTACGCCCTGCCGAACTGCCGCACGGCGAACCCGTCCAGTG	1440
GC	

图 1 *sawE* 基因及其两侧的 DNA 序列及推测的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence of *sawE* and flanking DNA and deduced amino acid sequence

Underlined sequences resemble the -35 and -10 regions of promoter ; RBS indicates

a potential ribosome binding site ; Putative ORFs are in bold characters.

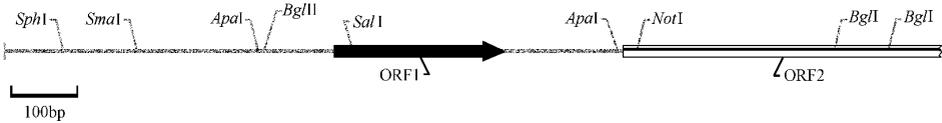


图 2 1.4kb DNA 片断的限制性物理图谱以及 ORF 的位置

Fig. 2 Restriction map of the cloned 1.4kb DNA fragment and the position and direction of ORFs in the fragment

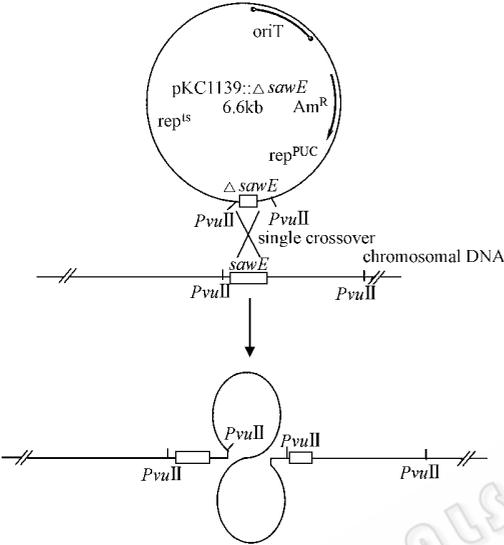


图 3 *sawE* 基因破坏示意图

Fig. 3 The diagram of *sawE* disruption

2.2 *sawE* 基因的功能研究

2.2.1 *sawE* 基因的破坏 根据 *sawE* 基因的序列进行分析,在 *sawE* 基因的内部设计一对引物 PS3 和 PS4,经 PCR 反应扩增出一段 177bp 的 *sawE* 内部片段(图略),将此片段经 *Eco*RI 及 *Hin*dIII 双酶切后回收,与经过同样酶切的质粒载体 pKC1139 连接,连接产物转化大肠杆菌 ET12567,得到用于基因破坏实验的去甲基化的重组质粒 pKC1139:: Δ *sawE*。将重组质粒 pKC1139:: Δ *sawE* 转化圈卷产色链霉菌 7100 原生质体,进行基因破坏实验,得到表型稳定的阻断突变株 7 株。随机选用四株提取其总 DNA,用 *Pvu*II 完全酶切后,以 *whiB* 基因为探针进行 Southern 杂交分析。结果显示圈卷产色链霉菌 7100 野生株总 DNA 在约 2.8kb 处有一条清晰的阳性信号带,而 *sawE* 破坏子的总 DNA 则在 2.5kb 及 0.9kb 处有两条阳性信号带(图 3 图 4),与理论计算相符,证明得到的阻断突变株确属基因交换后的结果。

性信号带(图 3 图 4)与理论计算相符,证明得到的阻断突变株确属基因交换后的结果。

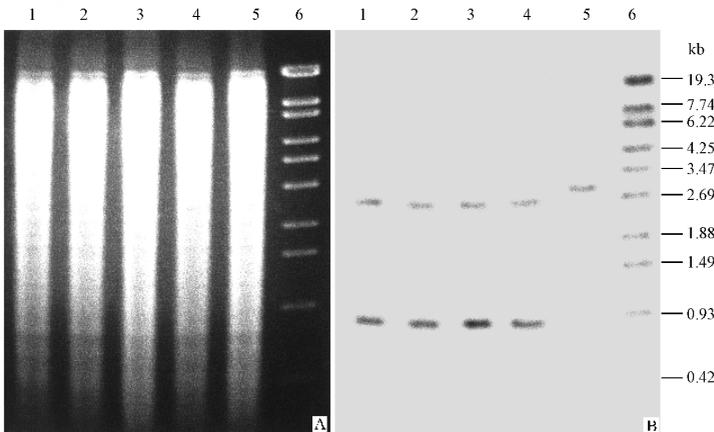


图 4 总 DNA 经 *Pvu*II 酶切的琼脂糖凝胶电泳 (A) 及 Southern 杂交 (B)

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis (A) and Southern hybridization of total DNA digested with *Pvu*II (B)

1 ~ 4 : Digested total DNA from the different disruptants ;

5 : Digested total DNA from wild type strain 7100 ; 6 : Molecular weight marker.

2.2.2 破坏子的功能研究 ①破坏子的表型及显微观察:将破坏子接种在以 0.5% 甘露醇为碳源的基本培养基上,在 28℃ 培养 7 d 观察其形态分化,同时在相同培养时间和条件下,接种圈卷产色链霉菌 7100 野生株及带有质粒 pKC1139 的 7100 野生株进行形态观察,结果表明 *sawE* 破坏子在延长培养时间的条件下仍然保持白色的表型,在培养基表面形成厚而松的形态,而野生型为灰色的表型(图 5)。同时对 *sawE* 破坏子的菌丝体进行了相差显微镜观察,结果显示 *sawE* 破坏子培养 7 d 后菌丝仍不能分隔,菌丝较长,形成紧密的螺旋,不能形成孢子链和成熟的灰色孢子,而野生型在相同的条件下,形成了孢子链和成熟的灰色孢子(图 6)。

②*sawE* 基因的阻断对圈卷产色链霉菌 7100 尼可霉素产生的影响:对 *sawE* 破坏子进行了尼可霉素产生的测定,以白假丝酵母(*Candida albicans*)为指示菌的抑菌实验的结果显示,*sawE* 基因的阻断不影响尼可霉素的生物合成(图略)。

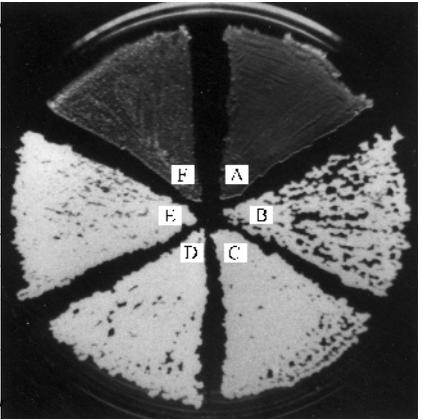


图 5 *sawE* 破坏子的表型

Fig.5 Phenotype of *sawE* disruptants

A :*S. ansochromogenes* 7100(grey);

B ~ E :Different *sawE* disruptants(white);

F :*S. ansochromogenes* 7100/pKC1139(grey).

2.2.3 *sawE* 基因的时空表达 利用绿色荧光蛋白(EGFP)基因为报告基因,将 EGFP 的基因插入到 *sawE* 基因的终止密码子后,使 EGFP 基因在 *sawE* 基因启动子的作用下共转录,构建的重组菌株接种在基本培养基平板上,于不同的时间进行观察,在共聚焦显微镜下未观察到 EGFP 表达后的荧光。此结果与 Soliveri 等人报道的将 *whiB* 基因的启动子克隆到儿茶酚双加氧酶基因的上游,未能检测到儿茶酚双加氧酶活性的试验结果一致^[8]。这可能是由于 *whiB* 的启动子的活性较低,表达的产物量较低,难以检测。这与 *whiB* 在链霉菌分化中短暂和微量表达有关。

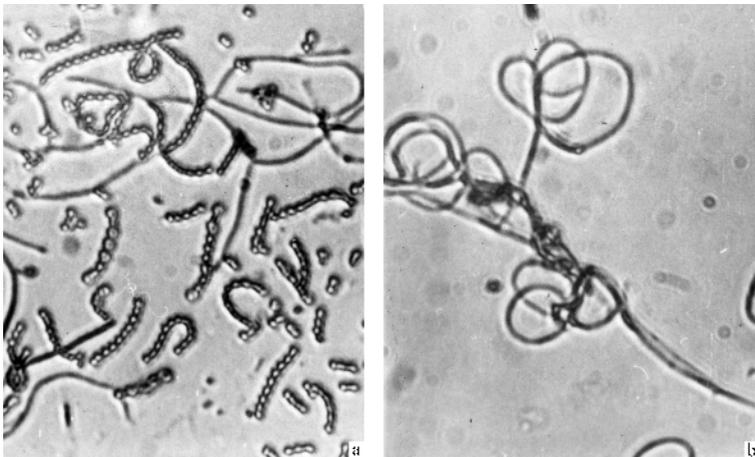


图 6 圈卷产色链霉菌 *sawE* 破坏子的显微照片

Fig.6 phase-contrast microscopy pictures of *S. ansochromogenes sawE* disruptant

a. *S. ansochromogenes* 7100 b. *sawE* disruptant.

3 讨论

圈卷产色链霉菌 7100 是一株从我国东北土壤中分离的尼可霉素产生菌,我们对圈卷产色链霉菌发育分化的分子机制的研究,主要着眼于它在形态分化上与模式菌株天蓝色链霉菌有很大的不同,以及所产生的尼可霉素所具有的重要的实用价值。研究结果显示, *sawE* 在圈卷产色链霉菌孢子形成的早期阶段起着关键的作用, *sawE* 的破坏使圈卷产色链霉菌的分化停止在气生菌丝阶段,气生菌丝不能形成分隔,无法形成孢子链,菌丝的生长不能正常的停止,表现为长而紧密的螺旋,延长培养时间菌丝体仍然保持白色的表型,不能进一步形成成熟的灰色孢子,而野生株在相同培养条件下,在发育分化过程中只形成一圈松散的螺旋,随着培养时间的延长,形成灰色成熟的孢子。上述结果表明 *sawE* 基因在圈卷产色链霉菌发育分化过程中可能控制菌丝螺旋。

对天蓝色链霉菌基因组数据库(www.sanger.ac.uk/Projects/S-coelicolor)的分析发现,在天蓝色链霉菌中至少有 10 个 *sawE* 的同源基因。用多序列同源分析程序 Clustalx 对它们相应的产物之间的同源性关系进行了分析(图略),结果显示它们都含有四个完全保守的半胱氨酸残基,这些半胱氨酸可能参与了分子内或分子间二硫键的形成,使其具有一个稳定的单体或多聚体的结构,并可能经由氧化—还原反应的形式发挥作用,此外它们还都具有一个保守的 $(\alpha/V/I)WGG$ 结构,在其下游为富含带正电荷氨基酸的螺旋区,该结构中连续的两个甘氨酸残基使该区域具有高度的柔韧性,这种特性对于保持其完整的功能至关重要,已有证据表明,当天蓝色链霉菌 WhiB 蛋白在该区域下游相邻的亮氨酸突变为刚性的脯氨酸后,WhiB 的活性完全丧失,与蛋白缺失的表型一致^[7]。

目前针对 *sawE* 的研究只是刚刚开始,根据其编码产物的氨基酸组成及结构分析,它可能是一个转录调控因子,具有非典型的 DNA 及蛋白质结合的作用域^[7],在基因表达的过程中起重要的调控作用。二级结构分析显示 SawE 不具有典型的 DNA 结合位点,说明可能这是一种新型的蛋白—DNA 的作用方式。*sawE* 的家族成员广泛存在于放线菌中,包括与人类疾病密切相关的病原菌——结核分枝杆菌和麻风分枝杆菌中也有多个类似基因,而在其它的细菌中尚未发现^[14]。使得对 *sawE* 及其家族成员的研究不仅有助于我们在物种进化等相关领域的了解,而且对基因的多效性的认识和疾病的防治也有重要价值。因此对有关 *sawE* 及其所结合的 DNA 结构,以及与之相互作用的相关蛋白之间的作用机制的研究,具有极其重要的理论和实际意义。相关的进一步研究在本实验室正在进行。

参 考 文 献

- [1] 谭华荣. 链霉菌分化的分子遗传学研究的新进展. 微生物学通报, 1993, **20**: 348 ~ 354.
- [2] Mendez C, Brana A F, Manzanal M B, et al. Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can J Microbiol*, 1985, **31**: 446 ~ 50.
- [3] Chater K F. Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology*, 1998, **144**: 1465 ~ 1478.
- [4] Chater K F. Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Current Opinion in Microbiology*, 2001, **4**: 667 ~ 673.
- [5] Flardh K, Findlay K C, Chater K F. Association of early sporulation genes with suggested developmental decision points in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, 1999, **145**: 2229 ~ 2243.

- [6] Ryding N J , Bibb M J , Molle V , *et al.* New sporulation loci in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* , 1999 , **181**(17) : 5419 ~ 5425 .
- [7] Davis N K , Chater K F . The *Streptomyces coelicolor whiB* gene encodes a small transcription factor-like protein dispensable for growth but essential for sporulation. *Mol Gen Genet* , 1992 , **232** : 351 ~ 358 .
- [8] Soliveri J , Brown K L , Buttner M J , *et al.* Two promoters for the *whiB* sporulation gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and their activities in relation to development. *J Bacteriol* , 1992 , **174** : 6215 ~ 6220 .
- [9] 谭华荣, 吴畏, 田宇清, 等. 圈卷产色链霉菌分化及其特征的研究. 微生物学报, 1994, **34**(4): 398 ~ 402 .
- [10] Kieser T , Bibb M J , Buttner M J , *et al.* Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich : The John Innes Foundation , 2000 .
- [11] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . Molecular cloning : a laboratory manual , 2nd ed . New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989 .
- [12] Ishikawa J , Hotta K . Frame Plot : a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G + C content. *FEMS Microbiol Lett* , 1999 , **174** : 251 ~ 253 .
- [13] Thompson J D , Gibson T J , Plewniak F , *et al.* The ClustalX windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* , 1997 , **24** : 4876 ~ 4882 .
- [14] Soliveri J A , Gomez J , Bishai W R , *et al.* Multiple paralogous genes related to the *Streptomyces coelicolor* developmental regulatory gene *whiB* are present in *Streptomyces* and other actinomycetes. *Microbiology* , 2000 , **146** : 333 ~ 343 .

Identification and Functional Characterization of *sawE*—a Gene Involved in Differentiation of *Streptomyces ansochromogenes* 7100^{*}

Xu Jianyong Liu Gang Tan Huarong^{**}

(Institute of Microbiology , Chinese Academy of Science , Beijing 100080 , China)

Abstract : A 2.8kb DNA fragment including *whiB*-like gene was cloned from the partial DNA library of *Streptomyces ansochromogenes* 7100 by using *whiB* of *Streptomyces coelicolor* J1501 as a probe. The nucleotide sequence of 1.4kb DNA fragment was determined and analyzed. The result showed that the fragment contains one complete open reading frame-designated *sawE*. *sawE* shows strong identity to *whiB*, an essential gene for early stage of sporulation. The deduced product of *sawE* gene is a regulatory protein. *sawE* disruptant was blocked at aerial hyphae stage of *Streptomyces ansochromogenes* 7100, no sporulation septation, no formation of grey mature spore. Disruptants maintained white phenotype on prolonged incubation. The result indicated that *sawE* is essential for the morphological differentiation of *S. ansochromogenes*.

Key words : *Streptomyces ansochromogenes*, *sawE* gene, Morphological differentiation

^{*} Key Project of Chinese National Natural Science Fund(39830010)

^{**} Corresponding author